

HPLC-ELSD 法测定胡芦巴提取物中 4-羟基异亮氨酸

惠玉虎, 杨朝昆, 寇玉锋, 任 静

(西安皓天生物工程技术有限责任公司, 陕西 西安 710075)

胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L., 又名香豆子、香苜蓿、芦巴子, 为豆科蝶形花亚科胡芦巴属一年生草本植物。胡芦巴种子中主要含有半乳甘露聚糖等多糖物质、蛋白质、芹菜香脂等。此外, 还含胡芦巴碱、游离氨基酸、甾体皂苷、香豆素和黄酮类物质。4-羟基异亮氨酸是胡芦巴中存在的一种非蛋白质氨基酸, 在调节血糖, 促进肌肉形成方面有独到的功效^[1]。胡芦巴中 4-羟基异亮氨酸的测定方法文献报道有 HPLC-ELSD 法^[2]。本实验的目的是对胡芦巴中 4-羟基异亮氨酸的测定方法进行改进, 改进后的检测方法不仅简便、快速、准确性、重现性好, 而且更加稳定。

1 仪器与试药

Waters1525 高效液相色谱仪、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司); Alltech ELSD2000ES 蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司)。4-羟基异亮氨酸对照品(美国 ChromeDex 公司, 质量分数为 99%)。胡芦巴提取物为西安皓天生物工程技术有限责任公司生产。三氟乙酸为分析纯, 水为二次重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Intersil ODS-3(150 mm×4.6 mm, 5μm); 流动相: 0.1% 三氟乙酸水溶液; 柱温: 室温; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 5 μL。ELSD 检测器条件: 漂移管温度: 115℃; 载气体积流量: 3.0 L/min。在此条件下, 4-羟基异亮氨酸保留时间约 7.5 min, 4-羟基异亮氨酸与其他组分达到基线分离, 分离度>1.5。理论塔板数按 4-羟基异亮氨酸计大于 3 500(图 1)。

2.2 对照品溶液制备: 精密称取 4-羟基异亮氨酸对照品适量, 加水超声溶解, 制成含 4-羟基异亮氨酸 0.141 mg/mL 的对照品溶液, 作为对照品储备液。

2.3 供试品溶液制备: 精密称取胡芦巴提取物约 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加入约 40 mL 水超声 30 min, 放置至室温, 加水至刻度, 即得。

2.4 线性关系考察: 精密吸取 0.141 mg/mL 4-羟基异亮氨酸对照品储备液 2.0、3.0、5.0、6.0 mL 于

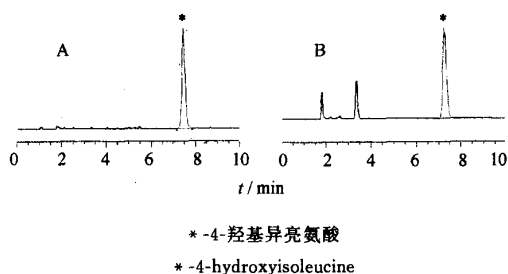


图 1 4-羟基异亮氨酸对照品溶液(A)和胡芦巴提取物供试品溶液(B)的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 1 HPLC-ELSD Chromatograms of 4-hydroxyisoleucine reference substance (A) and *T. foenum-graecum* extract (B)

10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 配制成质量浓度分别为 0.028、0.056、0.071、0.085 mg/mL 的对照品溶液, 在上述色谱条件下与 4-羟基异亮氨酸对照品储备液分别进样 5 μL, 进行 HPLC-ELSD 分析。以峰面积的常用对数为纵坐标, 以质量浓度常用对数为横坐标绘制标准曲线。其回归方程为 $\lg Y = 1.646 11 X + 6.767 6$, $r = 0.999 0$ 。由此可知, 4-羟基异亮氨酸在 0.028~0.141 mg/mL 线性关系良好。

2.5 精密度试验: 精密吸取同一份供试品溶液, 在上述色谱条件下重复进样 5 次, 测定 4-羟基异亮氨酸峰面积, 计算得其 RSD 为 1.14%。

2.6 稳定性试验: 将同一份供试品溶液分别在 0、2、4、6、8、10 h 内进样测定 4-羟基异亮氨酸峰面积, 计算得其 RSD 为 1.52%。结果表明, 供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.7 重现性试验: 取同一批胡芦巴提取物样品, 按供试品溶液的制备方法分别制备 5 份, 依法进样测定。结果 4-羟基异亮氨酸的平均质量分数为 414.7 mg/g, RSD 为 0.81%。

2.8 加样回收率试验: 精密称取批号为 20051025 的含 4-羟基异亮氨酸为 226 mg/g 的胡芦巴提取物 5 份, 每份 0.1 g, 分别精密加入 0.141 mg/mL 4-羟基异亮氨酸对照品储备液 2 mL, 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定。结果平均回收率为

98.75%, RSD为1.81%。

2.9 样品测定:分别精密称取5批样品,各3份,依法测定4-羟基异亮氨酸的峰面积,代入标准曲线计算其质量浓度,计算胡芦巴提取物中4-羟基异亮氨酸的质量分数,结果见表1。

表1 胡芦巴提取物中4-羟基异亮氨酸的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of 4-hydroxyisoleucine in *T. foenum-graecum* extract ($n=3$)

批号	4-羟基异亮氨酸/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%
20051102	405.7	0.68
20051126	410.1	0.90
20051203	406.5	0.38
20051211	407.4	0.63
20051229	406.0	0.31

3 讨论

由于4-羟基异亮氨酸在紫外条件下没有特征吸收,故选用HPLC-ESLD法测定。在ESLD检测条件的选择上,由于在流动相配比中水相的比例较高,所以设定漂移管的温度为115℃,在该温度条件

下流动相能充分汽化,出峰效果好。由于三氟乙酸比其他酸更易挥发,在检测过程基线噪音影响较小,而且样品分离效果也很好。

在流动相的选择上,开始选用0.1%冰醋酸水溶液-乙腈(90:10)作为流动相^[1],但在试验中发现在该流动相下,检测器基线噪音较大,保留时间也不重复,影响4-羟基异亮氨酸的检测。经多次试验选择0.1%三氟乙酸水溶液作为流动相,不仅峰形对称,保留时间重复稳定,而且4-羟基异亮氨酸与杂质的分离度效果好。

该方法准确性、稳定性及重现性能够符合测定要求,可作为胡芦巴提取物中4-羟基异亮氨酸的测定方法。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 2004.
- [2] Fang J, Liu Z Y, Xiong Z T. Determination of 4-hydroxyisoleucine contents in *Trigonella foenum-graecum* by HPLC-ELSD [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2004, 19 (5):355-356.

川芎提取物中阿魏酸大鼠在体肠吸收动力学的研究

杨星钢¹, 李 丁¹, 郭 宏^{1,2}, 张国华³, 张立波¹, 潘卫三^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 佳木斯大学化学与药学院, 黑龙江 佳木斯 154007

3. 沈阳药科大学成人教育学院, 辽宁 沈阳 110016)

阿魏酸是当归、川芎、阿魏等的有效成分之一,具有抗氧化、清除自由基、抗血栓、降血脂、防治冠心病、抗菌、抗病毒、抗突变、防癌、增加免疫功能、清除亚硝酸盐等作用^[1]。本实验从伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎中提取精制了川芎提取物(主要成分为阿魏酸),采用大鼠在体肠吸收实验方法,对川芎提取物中阿魏酸的吸收动力学进行研究,为川芎或其他含有阿魏酸的中药开发成缓释制剂提供生物学依据。

1 仪器、药品、试剂和动物

LC-10ATVP 型高效液相色谱仪、SPD-10AVP 型检测器(日本岛津公司);KQ-100DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司);UV-9100 紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);

HH-S 型恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂);HL-2 恒流泵(上海精科实业有限公司)。

川芎对照药材(中国药品生物制品检定所,批号:120918-200406);阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0773-9910);乌拉坦(进口分装);酚红(沈阳市试剂三厂);川芎药材(由辽宁泰伦有限公司)提供,按照《中国药典》2005年版鉴定,符合药典标准;D-101 大孔树脂(天津海光化工有限公司)。

甲醇(色谱纯);冰醋酸(分析纯);水为重蒸水;其他试剂为分析纯。

雄性 Wistar 大鼠,(200±20)g,沈阳药科大学动物实验中心提供。

2 方法与结果

2.1 川芎提取物的制备^[2]:将川芎饮片粉碎成粗

收稿日期:2006-04-28

作者简介:杨星钢(1974—),男,黑龙江省双鸭山市人,博士,主要从事缓释制剂与中药制剂现代化研究。

E-mail:yangxg123@163.com

* 通讯作者 潘卫三 Tel: (024)23986313 Fax: (024)23953241 E-mail:ppwwss@163.com